JP-A-7-51080

published on February 28, 1995

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出顧公開番号

特開平7-51080

(43)公開日 平成7年(1995)2月28日

(51) Int.Cl.6

設別記号 庁内整理番号

FΙ

技術表示箇所

C12P 19/04

A 7432-4B

C08B 37/00

C 7433-4C

P 7433-4C

// (C 1 2 P 19/04 C 1 2 R 1:645)

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全 5 頁)

(21)出願番号

特願平5-222290

(71) 出願人 000004101

日本合成化学工業株式会社

(22)出願日

平成5年(1993)8月12日

大阪府大阪市北区野崎町9番6号

(72) 発明者 山 上 知 秀

枚方市香里ケ丘8-12-2

(72)発明者 酒 井 紀 人

兵庫県多紀郡丹南町南矢代1071

(72)発明者 福 嶋 信 浩

枚方市香里ケ丘8-31-1

(54) 【発明の名称】 β-1, 3-グルカンの製造法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、品質の良い $\beta-1$, 3- グルカンを生産させ、更に生産性も向上させること目的とする。 【構成】 糖類、窒素化合物を含有する水性培地中で、オーレオパシディウム属に属する微生物を好気的発酵により培養するに当たり、培養中の水性培地のpHを4. $5\sim6$, 5 の範囲に制御する $\beta-1$, 3- グルカンの製造法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖類、窒素化合物を含有する水性培地中で、オーレオバシディウム属に属する微生物を好気的発酵により培養するに当たり、培養中の水性培地のpHを4.5~6.5の範囲に制御することを特徴とするβ-1.3-グルカンの製造法。

【 間求項 2 】 前記水性培地の p Hの制御範囲において、 p Hの最大値と最小値の差を 1 以内に制御することを特徴とする請求項 1 記載の $\beta-1$, 3- グルカンの製造法。

【請求項3】 前記水性培地のp Hの制御範囲において、pHを5.0~6.0の範囲に制御することを特徴とする請求項1 又は2 記載のB - 1 .3 - グルカンの製造法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は、オーレオバシディウム 属(Aureobasidium)に属する微生物を用いたβ-1、3-グルカンの製造法に関し、更に詳しく は、培養中の水性培地のpHを4、5~6、5の範囲に 20 制御するβ-1、3-グルカンの製造法に関する。

[0002]

【従来の技術】微生物多糖には、β-1、3-グルカ し、本発明を完成した、キサンタンガム、ブルラン、レバン等様々な多糖が 説明する。 あり、これら多糖は食品工業、化粧品工業、医薬品工 賞とする多糖を生産る。この中でも微生物発酵により得られるβ-1、3- る微生物としては、グルカンは、特に乳化安定性、生理活性、増粘効果、凝 第二研菌寄第125条性等多くの優れた機能を保持しており、又pH、温度 9)で寄託されてい等の環境の変化に対しても安定な物性を有していること 30 -1が挙げられる。 から産業上幅広い用途に期待されている。 【0008】本発明

【0003】該 $\beta-1$ 、3-グルカンはオーレオバシディウム属に属する微生物の好気的発酵により生産される 微生物多糖であり、その製造法に当たっては炭素源としてグルコース、フルクトースのような単糖類、あるいはシュークロースのような二糖類等が用いられ、窒素源としてはペプトンや酵母エキスの有機窒素源、硝酸ナトリウムや硝酸アンモニウムのような無機窒素源、又無機塩類としてマグネシウムやカリウム、硫酸、鉄等各イオンの塩が利用され、又必要であれば多糖生産促進剤としてアスコルビン酸等も添加され、 $\beta-1$ 、3-グルカンが得られる。(アグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー(Agri、Biol、Chem、)、47(6)1167(1983))。

[0004]

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、オーレ オパシディウム属に属する微生物を上記培地のままで培 触させることによっても当該多糖を得ることができる。 養する際、培養中の培地のpHが大きく変動し、特に菌 体の増殖にともないpH値は上昇し培養液表面に大量の 泡が発生し、培養液の損失や異常培養等を起こしてしま 50 のまま種々の用途に用いることも可能であるが、分離精

い、更に菌体の対数増殖期が終了し静止期に近づくと逆 にpH値の低下が起こり始めpH3程度まで下降する傾

にp H値の低下が起こり始めp H 3程度まで下降する傾向があり、このような低p H域では菌体の異化代謝による培養液、及び $\beta-1$, 3- グルカンの着色が起こる等の問題があり、培地のp H を制御しない培養系では常に良品質の $\beta-1$, 3- グルカンを製造することができず、又生産性についても充分なものではなかった。

【0005】又、特開昭55-37188号、特開平3-2202号等に示されるように、培養条件にpH値の10 範囲を定めた事例もあるが、これらは培養初期のpH値の設定のみであり、培養中のpH値を積極的に制御することはなされておらず、該方法をβ-1、3-グルカンの製造に利用しても上記と同じ問題点が残る。そこで、これら課題を解決したβ-1、3-グルカンの製造法が強く望まれている。

[0006]

【課題を解決するための手段】しかるに本発明者等はかかる課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、オーレオバシディウム属に属する微生物を好気的発酵により培養するに当たり培養中の水性培地のpHを4.5~6.5 の範囲に制御することで、生産性の高い、良品質のβー1、3ーグルカンを製造することができることを見出し、本発明を完成した。以下、本発明について具体的に説明する。

【0007】本発明において β -1、3-グルカンを主鎖とする多糖を生産するオーレオバシディウム属に属する微生物としては、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第12989号 (FERM P-12989) で寄託されているオーレオバシディウム sp. K-1 が挙げられる。

【0008】本発明においてβ-1,3-グルカンは、 次のようにして得ることができる。即ち、炭素源として シュクロース、グルコース又はフラクトース、窒素源と して硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニ ウム等の無機化合物、あるいは酵母エキス、ペプトン等 の有機天然窒素源、更に必要に応じてマグネシウム、鉄 等の金属イオンやアスコルビン酸、パントテン酸等のビ タミン類を添加した培地で、更に該培地のpHを4.5 ~6.5、好ましくは該範囲内でpHの最大値と最小値 の差が1以内、更に好ましくは5.0~6.0の範囲に 終始制御し、10℃~60℃、好ましくは25℃~35 *Cにて1日~10日間、好ましくは2日~6日間オーレ オバシディウム属に属する微生物を通気培養することに より8-1、3-グルカンを主鎖とする多糖を含有する 培養液を得る。又、上記方法で得られた菌体を集菌した 後洗浄して調製した洗浄菌体を用い、これを炭素源と接 触させることによっても当該多糖を得ることができる。 【0009】更に本発明で得られる8-1、3-グルカ ンを主鎖とする多糖は、上記方法で得られる培養液をそ

製して用いても良い。培養液からの当該多糖の分離は、 遠心分離沈降法あるいはセライト等の担体を用いた濾過 法によって菌体を除去し、得られた清澄液にメタノー ル、エタノール、イソプロピルアルコール等の溶媒、あ るいは銅、アルミニウム等の金属イオンを適量添加して 沈降せしめドラムドライヤー等乾燥装置を用いて乾燥 し、ハンマーミル、ボールミル等で粉砕し、粉末体を得

ることにより行うことができる。

[0015]

【0010】ここで本発明の培地のpHを上記範囲内に しては硫酸、塩酸、リン酸等の鉱酸類、あるいは酢酸、 クエン酸、リンゴ酸等の有機酸類が挙げられ、アルカリ としては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の各種水 酸化物が挙げられるが、いずれの場合もこれらに限られ ることはない。又酸、アルカリの各溶液の濃度は適宜調 整されるが、特に0、01~5N、好ましくは0.5~ 2 Nに調整され用いられることが望ましい。更に酸、ア ルカリの各溶液の添加量や添加方法についても特に限定 されることなく、該 p Hの範囲内で適宜適当量を添加す ればよい。又、添加装置には一般的なpHセンサー連動 20 型の装置を用いていれば特に限定されない。

【0011】本発明では、特にβ-1,3-グルカンの 中でもイオウ含有基を有するものが好適に製造可能であ り、該8-1、3-グルカンを製造するには前述の培養 条件に加えて硫酸マグネシウム・7水和物、硫酸第一鉄* *・7水和物等を添加する必要がある。

【0012】かかる方法で得られるβ-1、3-グルカ ンとは、オーレオバシディウム sp. K-1 (FER M P-12989)により生産されるものであり、主 に化1で示される構造単位と化2で示される構造単位と からなるものであり(1分子中の双方の構造単位数の合 計は1000~2000である。)、主鎖のグルコース に8-1, 6結合したグルコースの分岐をもち、好まし くはかつイオウ含有基を有する分岐β-1,3-グルカ 制御するに当たっては、酸とアルカリが用いられ、酸と 10 ンである。更に詳しくは、主鎖のグルコース4個あたり 3個がβ-1, 6結合したグルコースの分岐をもち、イ オウ含有基が多糖に対して0.1~1.0重量%結合し たβ-1, 3-グルカンが主である。本発明におけるイ オウ含有基とはスルホ酢酸基、スルホン酸基、ポリスル ホン酸基、システイン、シスチン、メチオニン等を示

> 【0013】かかる多糖の化学的、物理的性質及び構造 の解析法においては科学と工業64(3), 131~1 35 (1990) 及びアグリカルチュラル バイオロジ カルケミストリー(Agri. Biol. Che m.), 47(6)1167~1172(1983)に 詳細に述べられている通りである。

[0014] [(t1]

•3)β-D-Glc(1→3)-β-D-Glc(1→3)-β-D-Glc(1-

[但し、Glcはグルコース、Aはスルホ酢酸基、スル ホン酸基、ポリスルホン酸基、システイン、シスチン又 40 はメチオニン等のイオウ含有基を表す。〕

【0016】このような該 $\beta-1$ 、3-グルカンは、先 にも述べたように温度、pH等に対する安定性、乳化安 定性、生理活性、増粘効果、凝集性等優れた機能を有 し、工業関係、農業関係、塗料関係、洗浄関係、土木関 係等様々な所で多種多様な用途に用いることができる。 【0017】しかるに本発明の製造法は、構造、化学的 性質、物理的性質等従来のものと全く変わりのないβ-1,3-グルカンを品質良く生産することができ、更に 生産速度も向上し生産性の面でも優れた効果を示す。

[0018]

【作用】本発明の製造法は、従来問題とされていたpH の上昇による発泡現象、pHの低下により生じる菌体の 異化代謝に由来する培養液やβ-1,3-グルカンの着 色を軽減することができたことで、良品質の $\beta-1$, 3 - グルカンを得ることができ、更にβ-1,3-グルカ ンの生産性をも向上させることができた。

[0019]

【実施例】以下、本発明について実施例を挙げて具体的 に説明する。尚、実施例中「%」とあるのは特に断りの ない限り重量基準である。

50 実施例1

シュクロース3%、硝酸ナトリウム0.2%、リン酸水素2カリウム0.1%、塩化カリウム0.05%、硫酸マグネシウム・7水和物0.5%、硫酸第一鉄・7水和物0.001%、アスコルピン酸ナトリウム0.3%の培地組成を水に溶解し、該pHを5.5に調整後、500m1容坂口フラスコに100m1添加し、これを120℃で20分間滅菌した。これにオーレオバシディウム

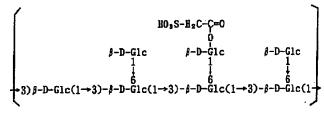
sp. K-1 (FERM P-12989)の同培地 懸濁液を1m1値菌し、27℃、120回転/分で3日 間往復振盪培養したものを種菌とし、これを前述のフラ 10 スコ培地同様に調製した81仕込みの101培養槽に無 菌的に100m1接種し、温度27℃、通気量61/ 分、回転数200回転/分で4日間培養を行った。

【0020】培養中の培地のpHは東京理化器機(株) 製のpH制御自動滴定装置により、酸として1N硫酸水 溶液、アルカリとして1N水酸化ナトリウムを用いて、* *終始5.5~6.0の範囲内に制御した。培養終了後、 これに水で5倍に希釈して遠心分離を行い完全に菌体を 除去した後、イソプロバノール及びアセトンで抽出操作 を繰り返し行い、析出した結晶を70℃で乾燥し、本多 糖を白色の繊維状結晶として得た。

【0021】 この多糖を常法により(科学と工業、64(3)、131~135(1990)及びアグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー(Agric. Biol. Chem., 47(6)1167~1172(1983)参照)分析したところ、その構造は化3で表される構造単位及び化4で表される構造単位からなることがわかった。イオウ含有量は多糖全体に対して0.05重量%であり、1分子中の双方の構造単位数の合計は約1500であった。

[0022]

[化3]



[但し、Glcはグルコースを表す。]

[0023]

※【化4】

ж

[但し、G]cはグルコースを表す。]

【0024】尚、評価は培地のp H値の経時変化、菌体の量を示すのに用いられるO D値(610 n m の光を照射)の経時変化、 $\beta-1$, 3- グルカンの生成量(培養終了後、固形分を除去した培養液11 当たりに含まれる $\beta-1$, 3- グルカンの重量(g)で示す。)についての経時変化、発泡による培養液の損失量(81 仕込みでの損失量(m1))、及び得られた $\beta-1$, 3- グルカンの着色について行った。

【0025】実施例2

実施例1 において、培養中の培地のp Hを終始5.0~6.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、白色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0026】比較例1

実施例1 において、培養中の培地のp Hを制御しなかった以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。 尚、評価についても実施例1 と同様に行った。 【0027】比較例2

実施例1 において、培地のp H初期値を5.0 に調整し、培養中の培地のp Hを終始3.5~5.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0028】比較例3

実施例1において、培地のpH初期値を6.0に調整し、培養中の培地のpHを終始6.0~7.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、淡黄色の本多糖を40 得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。

【0029】比較例4

実施例1において、培養中の培地のpHを終始3.5~7.0の範囲内に制御した以外は同様の方法で行い、黄土色の本多糖を得た。尚、評価についても実施例1と同様に行った。表1に実施例、表2に比較例の経時変化や評価結果をまとめて示す。

[0030]

【表1】

大字 中間 (610nm) 生成量 (2/1) 接換での 上で 日本 日本 日本 日本 日本 日本 日本 日	•	培養時間	培地の	OD値	か かかつの	発泡による	ı
実施例1	·				1	1	勢备庫
実施例1 0 5.5 0.2 48 5.6 3.3 1.2 0 72 5.5 5.3 2.3 96 5.5 7.2 3.5 24 5.9 1.3 0.2 48 5.6 3.3 1.2 0 72 5.0 5.5 2.1 96 5.0 7.6 3.0 * * (表2) Biblio Philips Rights Philips Ph		```		10202	i i		7 550
24 5.9 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.2 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.2 1.3 0.3 0.2 1.3 0.3	実施例 1	0	5.5		187.17	147 W.17	
実施例2 48 5.6 3.3 1.2 0 白色 実施例2 96 5.5 7.2 3.5 0 0 白色 実施例2 5.5 0 0.2 0 0 0 白色 24 5.6 3.3 1.2 0 白色 72 5.0 5.5 2.1 0 白色 72 5.0 7.6 3.0 0 0 白色 1] 培養時間 培地の 〇D値 かかの 発泡による	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			1.2	0.2	ľ	
実施例2 72 5.5 5.3 2.3 実施例2 0 5.5 3.5 24 5.9 1.3 0.2 48 5.6 3.3 1.2 0 72 5.0 5.5 2.1 96 5.0 7.6 3.0 ** * (表2) Graph Pales And						0	白岳
実施例2 96 5.5 7.2 3.5		1					""
実施例2 0 5.5 0 0.2 0 白色 24 5.6 3.3 1.2 0 白色 72 5.0 5.5 2.1 3.0 13 13 13 13 13 13 13 13 13 13 13 13 13							
24 5.9 1.3 0.2 48 5.6 3.3 1.2 72 5.0 5.5 2.1 96 5.0 7.6 3.0 1] * * (表2) 培養時間 培地の OD値 かかの 発泡による	実施例 2				<u> </u>		
48 5.6 3.3 1.2 0 白色 72 5.0 5.5 2.1 3.0 1.2 0 白色 1] * * (表2) 培養時間 培地の OD値 かかの 発泡による	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,			1.3	0.2		
72 5.0 5.5 2.1 96 5.0 7.6 3.0 1] * * (表2) 培養時間 培地の OD値 かかの 発泡による						n	p 在
96 5.0 7.6 3.0					i		""
* * (表2) 培養時間 培地の OD値 グルカンの 発泡による							
培養時間 培地の OD値 ダルカンの 発泡による		·	0.0			' 	'
	1)	i John shirterin tital				l State 1. w	
	•			1			
(hr) pH値 (610nm) 生成量 培養液の 着色度		(nr)	pH ₁	(610Jm)	1		宿色度
(g/1) 損失量 (ml)	11.44.64 4		<u> </u>		(g/1)	損失量(四)	<u> </u>
比較例 1 0 5.5	比較例 1			 			
24 6.5 1.5 0.2							
<u>48</u> 7.2 4.2 0.5 1500 黄土色						1500	黄土色
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$				-	1		
96 3.3 10.1 1.2		96	3.3	10.1	1.2		
比較例 2	比較例 2		<u>5.0</u>				
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		24					
48 5.0 2.8 0.6 0 白色	,	48		2.8	0.6	0	白色
72 5.0 3.9 1.1		72	5.0		1.1		
96 3.5 4.8 1.4		96	3.5	4.8	1.4		
比較例3 0 6.0	比較例3	0	6.0				
<u>24 6.0 1.6 0.2</u>		24_	6.0	1.6	0.2		ı
<u>48 7.0 4.1 1.9 1000 淡黄色</u>		48	7.0	4.1	1.9	1000	淡黄色
72 6.8 7.2 1.3		72	6.8	7.2	1.3		
<u> 96 6.0 8.9 1.8 </u>		96	6.0	8.9	1.8		
比較例4 0 5.5	比較例4	0	5.5		L		
24 6.5 1.5 0.2		24	6.5	1.5	0.2		
48 7.0 4.1 0.7 1500 黄土色		48	7.0	4.1	0.7	1500	黄土色
72 5.0 7.6 1.2		72	5.0	7.6	1.2		
96 3.5 9.5 1.8		96	3.5	9.5	1.8		

[0032]

[003

【発明の効果】本発明における $\beta-1$, 3-グルカンの 製造法は、良品質の $\beta-1$, 3-グルカンを生産するこ 40

とができ、更に生産速度も向上し生産性の面でも優れた効果を示す。